THESIS

MUNICH

1966

ÜBER DIE VERWENDBARKEIT DES EFFEKTS DER ERYTHROZYTENFREILEGUNG AUS BLUTTHROMBEN ZUR ERFASSUNG PROTEOLYTISCHER VORGÄNGE UND ZUR FRAGE DER WACHSTUMSBEEINFLUSSUNG VON IMPFTUMOREN DURCH PROTEOLYTISCHE FERMENTE

Eva Maria Anzer

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER

ÜBER DIE VERWENDBARKEIT DES EFFEKTS DER ERYTHROZYTENFREILEGUNG AUS BLUTTHROMBEN ZUR ERFASSUNG PROTEOLYTISCHER VORGÄNGE UND ZUR FRAGE DER WACHSTUMSBEEINFLUSSUNG VON IMPFTUMOREN DURCH PROTEOLYTISCHE FERMENTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eva Maria Anzer

aus München

München 1966

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 • Telefon: 22 17 77

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan: Prof. Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1966

Herrn Professor Dr. W. BÜNGELER, Direktor des Pathologischen Institutes, danke ich für die Übernahme des Referates.

Die Arbeit wurde in der chemischen Abteilung des Institutes ausgeführt.

Herrn Dr. phil. Dr. med. H. BAYERLE, Leiter der chemischen Abteilung, danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen.

Ebenso gilt mein Dank Frl. M. SCHNEIDER und Frl. H. WEIGL für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153512_0006

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Vor mehreren Jahren ist von A. GASCHLER (1) eine Therapie maligner Tumoren und chronischer Entzündungszustände auf der Basis einer parenteralen Zufuhr proteolytischer Fermente vorgeschlagen worden. Im Zusammenhang damit wurde auch eine Methode zur Erfassung der proteolytischen Aktivität des Blutes und zur Prüfung der Zweckmässigkeit einer solchen Behandlung oder zur Wertung eines Behandlungserfolges angegeben. Es handelt sich um einen geschlossenen Fragenkomplex, der im Zusammenhang betrachtet und beurteilt werden muss. Es ist im Laufe der Jahre, nach anfänglich starker Beachtung, um die GASCHLERschen Vorstellungen stiller geworden. Neuerdings aber finden sich wieder Hinweise, die den Wert der Methode hervorheben (siehe Vorträge und Diskussionsbeiträge beim Deutschen Krebskongress 1966 in München) (2).

Dies veranlasst uns, unsere eigenen Erfahrungen und Experimente zu diesen Vorstellungen in der vorliegenden Dissertation mitzuteilen. Wir beschäftigten uns nachfolgend im I. Kapitel mit dem Fragenkomplex der analytischen Methoden fibrinolytischer Vorgänge und im II. Kapitel mit Behandlungsversuchen von Impftumoren tragenden Tieren mit proteolytischen und anderen Fermenten.

I.
ZUR QUANTITATIVEN BEURTEILUNG VON FIBRINOLYTISCHEN UND THROMBOLYTISCHEN VORGÄNGEN

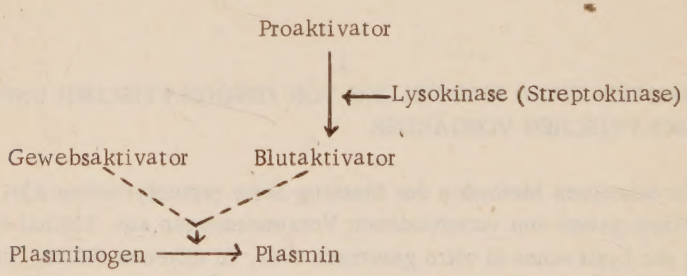
Die einzelnen Methoden der Messung einer proteolytischen Aktivität im weiten Sinne gehen von verschiedenen Voraussetzungen aus. Einmal ist es die Messung der Lysis eines in vitro gesetzten oder, in seltenen Fällen, in vivo spontan gebildeten Thrombus (Thrombolyse), andererseits wird die Auflösung eines isolierten oder im Serum befindlichen Fibrins direkt bestimmt (Fibrinolyse). Schliesslich kann die allgemeine proteolytische Aktivität des Blutes oder Serums gemessen werden (proteolytisches Potential). Es ist angebracht eine kurze Erläuterung dieser Begriffe und eine Beurteilung der biochemischen Grundlagen zu geben.

Das proteolytische Potential

Dieser Ausdruck ist von HALSE (3) geprägt worden. Es handelt sich um eine neue Bezeichnung für eine an sich altbekannte Sache. Wir brauchen hier nur das Wort Aktivität an die Stelle von Potential zu setzen, um zu erkennen, dass es sich prinzipiell um lange bekannte Vorgänge handelt. Es besteht jedoch der Unterschied, dass HALSE speziell an die Auflösung von Fibrin im Verlauf der Blutgerinnung dachte, während der Begriff der proteolytischen Aktivität alle Vorgänge einbezieht; die Spaltung eines einfachen Dipeptids ebenso, wie die Auflösung spezifischer Proteine etwa durch die sog. Abderhaldenschen Abwehrfermente.

Die Fibrinolyse

Darunter ist im engeren Sinne die fermentative Auflösung eines Fibringerinnsels zu verstehen. Hier denkt man natürlich an die neueren Forschungsergebnisse über das Ferment Plasmin (oder Fibrinolysin), seine Vorstufe Plasminogen und seine zahlreichen Hemmstoffe und Kinasen. Plasmin unterscheidet sich von anderen im Organismus vorkommenden Proteasen wenig hinsichtlich Substratspezifität und Intensität seiner Wirkung, selbstverständlich hingegen im Aufbau seines Enzymproteins. Bei der Aktivierung der Vorstufe Plasminogen kann zwischen einem Gewebs- und einem Blutaktivator unterschieden werden, ähnlich wie beim Gerinnungsvorgang bei der Aktivierung des Prothrombin. Folgendes Schema nach ASTRUP (4) zeigt diese Vorgänge übersichtlich:



(nach ASTRUP)

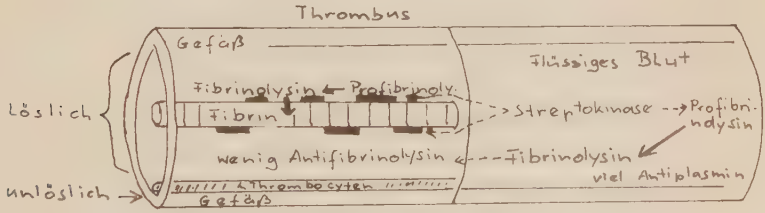
Seine besondere Substratspezifität und Wirkungsintensität erhält das Plasmin durch die starke Adsorption an Fibrin und den dadurch erreichten engen Kontakt. Ausserdem wird es hierbei dem Einfluss der Inhibitoren des strömenden Blutes, die neben den Aktivatoren eine sehr wichtige Rolle spielen, entzogen. DEUTSCH

(5) gelang es zwei verschiedene im Organismus vorkommende Antiplasmine nachzuweisen, und zwar ein sofort reagierendes und ein progressiv wirksames. So umfasst der Vorgang der Fibrinolyse eine Vielzahl von noch nicht in allen Einzelheiten nachgewiesenen und in ihrer Korrelation bekannten Einzelschritten aus Proferment, Aktivatoren und Inhibitoren.

Die Thrombolyse

Bei diesem Vorgang steht im Mittelpunkt der Betrachtung in einem gewissen Sinn ein morphologisches Gebilde, der Thrombus, ein komplexes Gerinnsel mit Strukturelementen von Zellen und Fasern, freilich ohne System. Diese gleichsam morphologische Struktur eines Thrombus wird so verändert, dass aus einem kompakten Thrombus ein lockeres, der Desorganisation verfallendes Gebilde entsteht. Es ist klar, dass die Thrombolyse Vorgänge der Proteolyse oder Fibrinolyse beinhaltet, aber darüber hinaus vollzieht sich etwas Augenfälliges, das Verschwinden einer morphologischen Pseudostruktur. Es muss ausserdem noch Berücksichtigung finden, dass ein Thrombus aus seinem Inneren heraus zerfallen oder durch die Aktivität seiner Umgebung zum Abbau gelangen kann.

Über den Ablauf von Fibrinolyse und Thrombolyse haben im Verlauf der letzten Jahre viele Autoren konkrete Vorstellungen entwickelt und experimentell unterbaut. Bezüglich der Enzymologie der Fibrinolyse kann unter anderem auf die Schule von ASTRUP (l.c.) verwiesen werden. Zur Thrombolyse gibt es ältere Hinweise von BAYERLE und Mitarbeitern (6). Eine umfassende und alle theoretisch möglichen Einzelheiten einbeziehende Darstellung verdanken wir MARX (7).



⟶ Einwirkung auf
⟶ Übergang in

(nach MARX)

Dieses Schema zeigt den Vorgang der Thrombolyse unter der Einwirkung von Streptokinase. Diese aktiviert im Thrombus selbst direkt am Fibrin hängendes Profibrinolysin, das dann bei engem räumlichen Kontakt und geringer Konzentration an Antifibrinolysin Fibrin aufzulösen vermag. Daneben kommt es in geringerem Ausmass zur Lösung von aussen, durch die Aktivierung des im umgebenden, flüssigen Blut befindlichen Profibrinolysins. Soviel über die Vorgänge der Fibrinolyse und Thrombolyse im allgemeinen.

Für die praktische Anwendung zum Zwecke der Erfassung von Einzelvorgängen als Kontrolle eines Therapievorschlages, wie im einleitenden Absatz ausgeführt ist, handelt es sich nun seit langem darum, eine hinreichend sichere Methode zu finden und auszuwerten. Versuche hierzu sind in grosser Zahl unternommen worden.

Die einzelnen Methoden der Fibrinolysebestimmung unterscheiden sich vor allem in der Wahl des Substrates, in der Gewinnung des aktiven proteolytischen Fermentes aus dem Blut, bzw. dessen Aktivierung und der Auswertung der induzierten biochemischen Vorgänge. Als Substrat finden in der Hauptsache Verwendung menschliches und tierisches Fibrin, Casein und synthetische Aminosäurederivate, die Lysin oder Arginin enthalten.

Fibrin als spezifisches Substrat wird am häufigsten angewendet bei der Lysiszeitmethode und der Fibrinplattenmethode. Eine einfache Durchführung der ersteren wurde von McFARLANE und BIGGS (8) vorgeschlagen. Als Mass für die fibrinolytische Aktivität des Blutes wird die Zeit für die vollständige Auflösung einer im Plasma ausgefällten Fibrinflocke gewertet. Man geht dabei so vor, dass man Citratplasma rekalzifiziert, den Ansatz bei 37°C aufbewahrt und stündlich beobachtet, bis sich das Fibringerinnsel aufgelöst hat. Nach BAYERLE und KIRSTEIN (9) wird die Fibrinflocke nicht im umgebenden Serum belassen, sondern mit Hilfe eines Drahthäkchens herausgenommen, 3 mal in phys. NaCl-Lösung gewaschen und anschliessend in Phosphatpuffer von pH 7,8 übergeführt. Dadurch wird das Fibrin dem Einfluss der teils aktivierenden, teils hemmenden Faktoren des Serums entzogen. Die Auflösung kann chemisch analytisch oder visuell verfolgt werden. Dieser Vorgang beruht auf der Tatsache, dass das Plasmin bei der Fibringerinnung teils adsorptiv, teils mechanisch an das Fibrinnetz gebunden wird und in engen Kontakt mit dem Substrat tritt. BAYERLE und Mitarbeiter (10) fanden eine weitere Beschleunigung der Lysis nach Vorbehandlung des Fibrinkoagulums mit Aceton-Äther. Diese "aktivierende" Wirkung, die bekanntlich auch Chloroform und Toluol besitzen, beruht zweifellos auf einer irreversiblen Ausschaltung von Hemmstoffen.

Bei der Fibrinplattenmethode nach ASTRUP (11) wird eine Fibrinogenlösung mit Thrombin zur Gerinnung gebracht und die zu prüfende fibrinolytisch

wirksame Substanz auf diese Platte aufgetragen. Nach einer bestimmten Zeit wird die Grösse des entstandenen Lysishofes gemessen, welche als Mass für die fibrinolytische Aktivität gilt.

Bereits kleinste Fibrinspaltungen werden durch Verwendung von Isotopen nach CLEMENT und McNICOL (12) und SAWYER und Mitarbeitern (13) erfasst. Es wird hierbei die freigesetzte Radioaktivität von mit J^{131} markiertem Fibrin bestimmt.

Die Messmethoden der Fibrinauflösung haben den Vorteil, dass Fibrin auch in vivo den Angriffspunkt des Plasmin bildet und dieses gegenüber dem Fibrin am wirksamsten ist. Man kommt somit den physiologischen Verhältnissen am nächsten. Es ist allerdings bei Handelspräparaten zu beachten, dass sie nicht immer einheitlich gereinigt sind, sondern Begleitstoffe sowohl mit Aktivator-, als auch mit Inhibitorwirkung enthalten können. Ausserdem kann die schwankende Fibrinkonzentration bei Messung der Fibrinauflösung im Serum zu Ungenauigkeit führen.

Obwohl Plasmin gegenüberFibrin besonders wirksam ist, spaltet es auch verschiedene andere Eiweissstoffe. Casein hat sich als Substrat besonders bewährt und viele Variationen zur Bestimmung der proteolytischen Enzyme im Blut und Geweben sind angegeben worden. Erwähnt seien die Methoden von MARX und BAYERLE (14) und DOWNIE und CLIFFTON (15). Im Prinzip wird dabei so vorgegangen, dass zunächst die Euglobulinfraktion des Serums, die Plasminogen/Plasmin enthält, nach MILSTONE (16) oder einem ähnlichen Verfahren gewonnen wird. DOWNIE und CLIFFTON, DILLARD und CHANUTIN (17), ROCHA E SILVA und RIMINGTON (18) fällen diese Fraktion durch starke Verdünnung des Serums und Säuerung auf pH 5,2-5,4 mit verdünnter Essigsäure. Der Niederschlag wird anschliessend in Veronalpuffer (pH 7,4-7,6) gelöst. LEWIS (19) gewinnt die enzymhaltige Lösung durch Alkoholpräzipitation (25 %) und anschliessende Lösung in Boratpuffer. Diese Enzymlösung lässt man auf eine meist 5 %ige Caseinlösung einwirken. Die Höhe der proteolytischen Aktivität ergibt sich aus der Menge der abgespaltenen aromatischen Aminosäuren Tyrosin/Tryptophan, die photometrisch mit Hilfe des Phenolreagenses nach FOLIN-CIOCALTEAU bestimmt werden. Um möglichst das gesamte Plasminogen/Plasmin zu erfassen, können aktivierende Stoffe, insbesondere Streptokinase, zugefügt werden.

Leider ist auch Casein nicht absolut einheitlich, es besitzt aber gegenüber Fibrin den Vorteil, dass es nicht als Adsorbens für Fibrinolysefaktoren des Blutes wirkt.

Autoren, die die Unsicherheitsfaktoren des Fibrins und Caseins nicht annehmen wollen, bedienen sich der Messung der Esteraseaktivität des Plasmins. Hierbei finden synthetische Ester bestimmter Aminosäuren Verwendung, so z.B.

Toluolargininmethylester und Lysinmethylester nach TROLL und Mitarbeitern (20). Da diese Methode aber auch nicht empfindlicher ist und eine Interferrenz anderer Plasmaproteasen mit Sicherheit nicht ausgeschlossen werden kann, ist sie auch nur bedingt anzuwenden.

Die Schwierigkeit aller Laboratoriumsmethoden der Fibrinolysebestimmung liegt darin, dass jeweils nur ein Teil der in vivo wirksamen Faktoren erfasst wird, was aber nicht ausschliesst, dass Rückschlüsse darauf gezogen werden können.

Vor mehreren Jahren ist von GASCHLER (21) eine Methode zur Erfassung des proteolytischen Potentials des Blutes ausführlich beschrieben und propagiert worden. Diese Methode fand und findet neuerdings wieder Beachtung (22, 23). Sie wird wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:
Es werden genau 2 ccm Venenblut entnommen, vorsichtig in ein Glasröhrchen von 1-1,3 cm Durchmesser gegeben und verschlossen bei Zimmertemperatur (20°) für 24 Stunden stehen gelassen. Darauf gibt man mit einer Pipette 2 ccm phys. NaCl-Lösung und durch schonendes Umkippen des mit dem Daumen verschlossenen Röhrchens wird eine Vermischung des Serums mit der NaCl-Lösung erzielt. Der "Blutklott" muss sich beim Umdrehen vom Boden lösen, damit auch das darunter befindliche Serum erfasst wird. Falls er festhaftet, kann man ihn mit einem dünn ausgezogenen Glasstab oder einer Drahtschlinge von der Glaswand lösen. Eine Verletzung des Blutklottes ist dabei zu vermeiden. Nach 10-15 sec wird der Hämoglobingehalt in der überstehenden, bzw. in der den Blutklott umgebenden Flüssigkeit gemessen. Folgende Methoden werden hierzu angegeben:

1. Hämometer der Firma Zeiss Ikon.
2. Polytest-Gerät der Firma Zeiss Ikon.
3. Hämometer nach Sahli. Niedrige Werte hiermit nicht erfasstbar.

Auswertung: Hämoglobinwerte des Serums zwischen 3 und 20 % bedeuten keinerlei Anzeichen für malignen Tumor. Unter 2 % entweder Krebs oder Krebsschutz sehr gering.
Unter 1 % noch kein Fall bekannt, der nicht Krebs gehabt oder innerhalb von 6 Monaten keinen malignen Tumor bekommen hätte.

Das Prinzip dieser Methode soll nach GASCHLER darin bestehen, dass bei 24-stündigem Stehen die den "Blutklott" umgebenden proteolytischen Fermente des Serums einen Teil des Fibrins abbauen und dadurch vom Fibrin eingeschlossene Erythrocyten frei werden. Diese finden sich nach dem Umschütteln im Überstand und werden bei der Hämoglobinbestimmung erfasst. Je mehr fibrinolytische, bzw. proteolytische Fermente vorhanden sind, bzw. je höher ihre Akti-

vität ist, umso mehr Erythrocyten sollen freigelegt werden. Demnach stellt also der so erhaltene Hämoglobinwert ein Mass für die proteolytische Aktivität des Blutes dar. Soweit die Beschreibung der Methode. GASCHLER kommentiert ihren Wert u.a. wie folgt: "Von besonderer Bedeutung ist der Test für die Frühdiagnose und Prognose von Krebs, Tuberkulose, Paradentose und schweren chronischen Entzündungszuständen. Liegen abnorm niedrige Werte vor, so liegt grosser Verdacht auf Carcinom oder Tuberkulose vor. Ein Absinken der Werte zeigt bei Krebs mit Sicherheit Rezidive frühzeitig an. Ein fortgesetztes Ansteigen der Fibrinolyse-Werte bedeutet zuverlässig fortschreitende Besserung". Ausgangspunkt für die Ausarbeitung der Methode und die Untersuchungen von GASCHLER war die Feststellung, dass bei Patienten mit malignen Tumoren, Tuberkulose und entzündlichen Erkrankungen die proteolytischen Fermente im Blut vermindert waren. Nach WOLF (24) und GASCHLER kommt es durch einen Mangel an katabolen Enzymen, besonders tryptischen, und ein Übermass an Inhibitoren, wie Antitrypsin, erst zu einem manifesten Krebswachstum, entstehend aus verstreuten Embryonalzellen, welche bei verschiedenartigen Reizungen zu vermehrter Zellteilung angeregt werden. Die proteolytischen Fermente hätten die Aufgabe tote und mitotisch entartete, somit ungeschützte Zellen aufzulösen, was bei einer Verminderung dieser Fermente nicht mehr möglich ist. Demnach könnte man also aus einem stark erniedrigten proteolytischen Potential des Blutes auf das Vorliegen eines malignen Tumors oder eine chronisch entzündliche oder tuberkulöse Erkrankung schliessen.

Es erhebt sich die Frage, in welche Kategorie von Bestimmungen, im Sinne der oben gegebenen Ausführungen, die GASCHLERsche Methode einzuordnen ist. Wir meinen es handelt sich um eine Methode der Thrombolysebestimmung und die hierbei zutreffenden Kriterien sind zu beachten. Ist nun aber die Freilegung von Hämoglobin oder von Erythrocyten als Massstab für die proteolytischen Fermente des Blutes zu werten? Nur mit Vorbehalt, denn es besteht wohl kein Zweifel, dass es sich um einen viele Einzelfaktoren einbeziehenden Test handelt und damit sind schon, auch ohne statistische Prüfung der Zuverlässigkeit, die Grenzen seiner Anwendbarkeit aufgezeigt. Bei der Blutgerinnung werden die korpuskulären Bestandteile in ein feines Fibrinnetz eingeschlossen und das Serum wird bei der Retraktion ausgepresst. So kann man sich zwei verschiedene Blutproben mit etwa der gleichen Menge an Erythrocyten und an proteolytischen Fermenten vorstellen, von denen die eine eine hohe Retraktionskraft besitzt und viel Serum auspresst, die zweite aber nicht. Demnach finden sich im ersten Fall entsprechend viel Proteasen im umgebenden Serum und es kann mehr Fibrin abgebaut werden als in der zweiten Probe mit geringer Retraktionskraft. Beide Proben werden also bei gleichem Gehalt an

proteolytischen Fermenten des Blutes eine unterschiedliche Hämoglobinmenge im überstehenden Serum ergeben. Daneben kommt es aber, wie bei der Methode der Lysiszeitbestimmung ausgeführt wurde, auch auf den Kontakt Fibrin-Plasmin-Effektoren an. BAYERLE und Mitarbeiter (l.c.) haben nachgewiesen, dass Erythrocyten einen Inhibitor für fibrinolytische Fermente enthalten oder als solche inhibierend wirken. Ebenso können auch Leukocyten und Thrombocyten eine hemmende Wirkung entfalten. Ausserdem befinden sich im umgebenden Serum inaktives Plasminogen, Aktivatoren und Inhibitoren, die bei wechselnder Zusammensetzung eine unterschiedliche Spaltung ergeben. Schliesslich können geringe Änderungen des physikalischen Aggregatzustandes des Fibringels die Haftfestigkeit der Erythrocyten verringern, wobei es sich keineswegs um eine Lysis zu handeln braucht. Somit ist die Freilegung von Erythrocyten in ihrer Bedeutung schwierig zu bewerten, da eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle spielt. Es ist ferner noch zu beachten, dass bei der Durchführung der Methode, bei der Ablösung des Koagulums von der Glaswand und beim Umschütteln, auch wenn dies vorsichtig geschieht, rein mechanisch eine unbestimmte Menge von Erythrocyten freigelegt wird und zu Ungenauigkeit führt.

Wir haben bei den eigenen Untersuchungen zunächst die Reproduzierbarkeit der Methode in Parallelansätzen mit einem Blut nachzuweisen versucht und dann aber auch eine grundsätzlich andere Arbeitsweise auf der Basis Proteolyse zum Vergleich herangezogen. Als solche schien uns die Methode der Euglobulinfällung und deren Einwirkung auf Casein nach DOWNIE und CLIFFTON (l.c.) geeignet. Hierbei wird mit einer bekannten Menge eines definierten Substrates (Casein) gearbeitet und durch Verwendung einer bestimmten Serumfraktion werden die Inhibitoren weitgehend ausgeschaltet. Durch Aktivierung mit Streptokinase wird möglichst das gesamte Plasminogen/Plasmin erfasst.

Versuche zur Reproduzierbarkeit der Methode

Versuchsmaterial

Frischblut von 18 gesunden Versuchspersonen im Alter von 20-30 Jahren. Frischblut von Patientinnen aus der Strahlenabteilung der Univ.-Frauenklinik mit gesicherten Carcinomen, teils unbehandelt, teils bestrahlt. Insgesamt 51 Fälle.

Zur Methodik

Die Bestimmung des proteolytischen Potentials des Blutes nach GASCHLER wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Messung des Hb-Wertes erfolgte mit

dem Photometer nach Eppendorf folgendermassen: Vom Überstand (Serum-NaCl-Mischung) wurden 0,2 ml zu 5,0 ml einer 0,04 % NH_4OH gegeben, die Extinktionsdifferenz gegen Wasser bei einem Filter von 578 mμ Hg bestimmt und in %Hb umgerechnet (diese Vorschrift des Photometer Eppendorf entspricht nach GASCHLER der Methode 2). Da bei der Durchmischung des Serums mit der NaCl-Lösung immer mehr oder weniger Erythrocyten mechanisch aus dem Blutkoagel herausgelöst werden, wurde die Probe nach der Entnahme der 0,2 ml 5 min bei 3500 U/min zentrifugiert und vom Überstand ebenfalls eine Hämoglobinbestimmung durchgeführt. Von einer zweiten Blutprobe der einzelnen Versuchspersonen wurde die proteolytische Aktivität des Serums nach der Methode von DOWNIE und CLIFFTON (l.c.), wie nachfolgend beschrieben, bestimmt:

Verwendete Substanzen:

1. Caseinlösung 5 %. Casein Hammersten in 0,06 n NH_3 gelöst und mit 0,1 n HCl auf pH 7,35-7,45 eingestellt.
2. Veronalpuffer pH 7,35.
3. Streptokinase Behringwerke. 5000 E in 5,0 ml Aq.dest. gelöst.
4. Trichloressigsäure 20 %.
5. Essigsäure. 0,32 ml einer 1 %igen Essigsäure mit 19,0 ml Aq. dest. verdünnt.
6. Natronlauge 1 n.
7. Phenolreagens nach Folin-Ciocalteau. 1 : 3 mit Aq.dest. verdünnt.
8. Serum von nicht hämolysiertem, unter sterilen Bedingungen entnommenem Blut.

Versuchsbeschreibung:

1,0 ml Serum wird mit 19,0 ml verdünnter Essigsäure versetzt, einmal durchgeschüttelt und anschliessend 15 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag, der Plasminogen enthält, wird in 1,0 ml Veronalpuffer gelöst. Je 0,5 ml dieser enzymhaltigen Lösung werden in ein Versuchsröhrchen gegeben. Zum ersten gibt man 0,2 ml Streptokinase (= 200 E), 0,3 ml Puffer und 7,0 ml Caseinlösung. Nach gründlichem Durchmischen werden jeweils sofort 2,5 ml entnommen und mit 5,0 ml Trichloressigsäure zur Eiweissfällung versetzt. Der Rest der Ansätze wird 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt und anschliessend je 2,5 ml mit 5,0 ml Trichloressigsäure enteiweisst. Die nach 0 bzw. 48 Stunden erhaltenen Proben werden 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert und das im klaren Überstand enthaltene Tyrosin/Tryptophan wird photometrisch bestimmt, als Mass für die stattgefundene Caseinspaltung. Zu je 2,5 ml des Überstandes

werden 5,0 ml NaOH und 1,5 ml des verdünnten Phenolreagens gegeben. Nach genau 10 min wird die Extinktion des 48-Stunden-Wertes gegen den entsprechenden 0-Stunden-Wert, der gleich Null gesetzt wird, abgelesen, bei einem Filter von 578 mμ Hg. Schichtdicke der Küvette 1,0 cm.

Die gefundenen Werte sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

TABELLE I

Vergleich der Proteolyse von Normalserum mit der Thrombolyse in vitro

Protokoll Nr.	Plasminogen/Plasminbestimmung nach Downie und Cliffton			Thrombolyse nach Gaschler	
	d E_1 mit SK	d E_2 ohne SK	d E_1-d E_2	% Hb	% Hb zentrif.
1	0,40	-	-	1,64	0,262
2	0,36	-	-	0,818	0,32
3	0,76	-	-	0,998	0,36
4	0,75	0,26	0,49	0,7872	0,328
5	0,80	0,23	0,57	0,8528	0,164
6	0,72	0,31	0,41	0,6232	0,164
7	0,69	0,34	0,35	0,82	0,36
8	0,76	0,27	0,49	2,0	0,0656
9	0,86	0,23	0,63	2,788	0,1312
10	0,76	0,26	0,50	1,7384	0,2296
11	0,79	0,47	0,32	1,2176	0,2296
12	0,70	0,24	0,46	3,5656	0,3936
13	1,18	1,05	0,13	1,312	0,4592
14	1,22	0,32	0,90	1,476	0,8528
15	0,86	1,10	-	1,7712	0,492
16	0,82	0,28	0,52	1,476	0,7215
17	0,86	0,33	0,53	0,656	0,0984
18	0,78	0,34	0,44	0,82	0,164

TABELLE II

Vergleich der Proteolyse von Carcinomserum mit der Thrombolyse in vitro

Protokoll Nr.	Diagnose	Plasminogen/Plasminbestimmung nach Downie und Cliffton			Thrombolyse nach Gaschler	
		d E_1 mit SK	d E_2 ohne SK	d E_1-d E_2	% Hb	% Hb zentrif.
1	Vagina Ca	0,85	0,29	0,56	1,0285	0,164
2	Ovarial Ca	0,94	0,32	0,62	0,656	0,1986
3	Collum Ca II	0,99	0,53	0,46	1,148	0,197
4	Collum Ca III	1,00	0,38	0,62	2,132	0,2624
5	Corpus Ca	1,27	0,25	1,02	0,3936	0,246
6	Collum Ca II	1,00	0,34	0,66	1,476	0,328
7	Collum Ca II	1,50	0,43	1,07	0,914	0,164
8	Ovarial Ca	1,25	0,25	1,00	0,5248	0,164
9	Collum Ca I	1,05	0,29	0,76	1,312	0,1312
10	Collum Ca II	1,68	0,30	1,38	0,8583	0,328
11	Corpus Ca	0,86	-	-	1,312	0,3608
12	Collum Ca III	0,86	0,82	0,04	0,6888	0,2952
13	Ovarial Ca	1,09	0,73	0,36	0,9184	0,1968
14	Ovarial Ca	0,92	0,47	0,45	1,4432	0,2296
15	Collum Ca I	1,00	0,40	0,60	1,476	0,1968
16	Collum Ca III	0,92	0 64	0,28	0,5904	0,492
17	Ovarial Ca	1,28	0,32	0,96	0,5904	0,2624
18	Collum Ca III	0,92	0,36	0,56	1,1152	0,164
19 +	Corpus Ca	0,85	0,46	0,39	1,312	0,164
20	Collum Ca III	0,81	0,39	0,42	0,5248	0,0565
21	Collum Ca III	0,70	0,29	0,41	1,64	0,0984
22	Collum Ca II	0,64	0,82	-	0,3936	0,3936
23	Corpus Ca	0,72	0,25	0,47	8,036	0,328
24	Collum Ca II	0,68	0,30	0,38	0,82	0,1968
25	Collum Ca III	0,74	0,26	0,48	0,82	0,164
26	Corpus Ca	0,93	0,38	0,55	0,656	0,033
27 +	Corpus Ca	0,75	0,47	0,28	0,6888	0,0328
28	Collum Ca III	0,88	0,43	0,45	0,656	0,164
29	Collum Ca II	0,76	0,36	0,40	1,5416	1,496
30	Collum Ca I	0,72	0,31	0,41	0,3936	0,164
31	Collum Ca III	0,77	0,28	0,49	0,410	0,164
32	Collum Ca I	1,00	0,28	0,72	0,5248	0,1312
33	Collum Ca III	0,80	0,27	0,53	0,6332	0,1968
34	Ovarial Ca	1,23	0,64	0,59	0,492	0,1312
35	Corpus Ca	1,19	0,81	0,38	0,2924	0,082
36	Collum Ca II	0,99	0,26	0,73	0,164	0,0984
37	Collum Ca III	0,84	0,53	0,31	1,1152	0,164
38	Collum Ca I	0,85	0,25	0,60	0,9512	0,2296
39	Collum Ca II	0,80	0,31	0,49	0,4592	0,164
40 +	Ovarial Ca	0,92	0,37	0,55	0,9512	0,0652
41	Collum Ca II	1,24	0,39	0,85	0,6232	0,1312
42	Collum Ca III	1,35	0,32	1,03	0,2952	0,164
43	Collum Ca II	-	-	-	0,5576	0,1968
44	Collum Ca I	0,99	0,37	0,62	0,7216	0,1968
45 +	Collum Ca II	0,91	0,32	0,59	1,0496	0,0984
46	Corpus Ca	1,80	1,05	0,75	0,82	0,1312
47	Collum Ca II	0,82	0,28	0,54	0,4592	0,1312
48	Corpus Ca	1,02	0,40	0,62	0,3936	0,2296
49 +	Corpus Ca	,26	1,25	0,01	0,5576	0,328
50	Collum Ca III	83	0,37	0,46	1,0496	0,164
51	Ovarial Ca	0,71	0,33	0,48	1,476	0,164

Zusammenstellung der Versuchsergebnisse von Tabelle I und II

	Mittelwert	Mittlerer Fehler des Ergebnisses	Mittlerer Fehler der Einzelmessung
I Gesunde Versuchspersonen			
d E_1 mit SK	0,79	± 0,048	± 0,22
d E_2 ohne SK	0,40	± 0,072	± 0,28
d E_1-d E_2	0,45	± 0,046	± 0,172
% Hb	1,43	± 0,183	± 0,865
% Hb zentrif.	0,32	± 0,049	± 0,248
II Carcinom-patientinnen			
d E_1 mit SK	0,98	± 0,035	± 0,247
d E_2 ohne SK	0,42	± 0,031	± 0,247
d E_1-d E_2	0,56	± 0,036	± 0,253
% Hb	0,99	± 0,152	± 1,090
% Hb zentrif.	0,22	± 0,032	± 0,230

Zeichenerklärung:

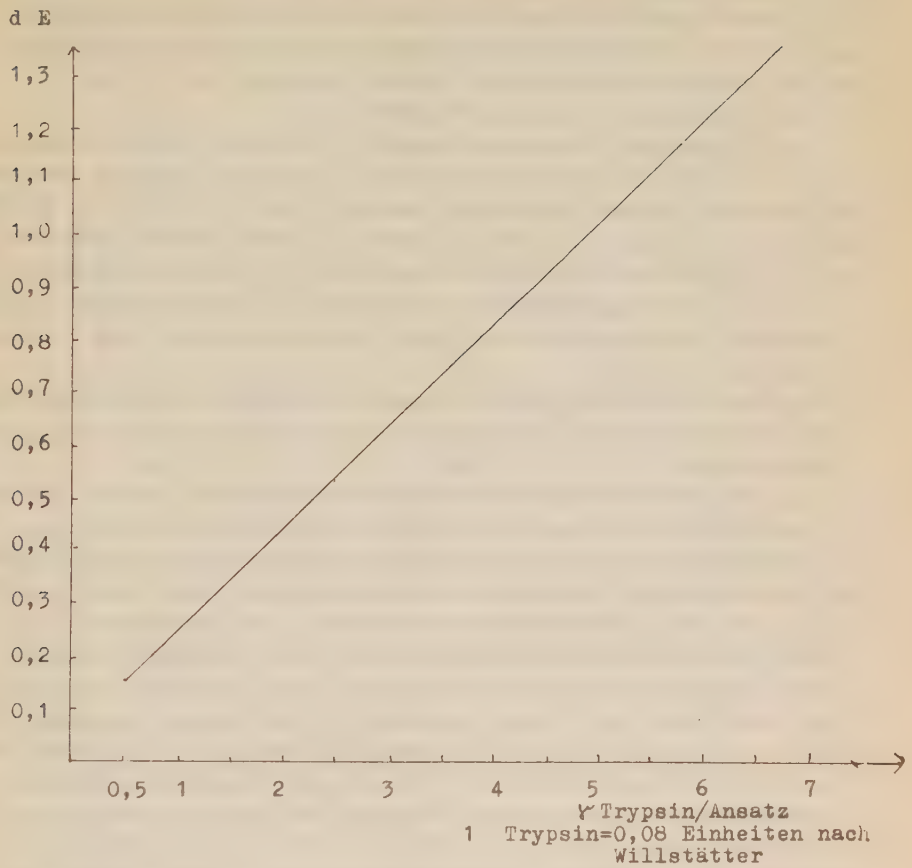
d E = Extinktionsdifferenz gegen Null-Wert (entsprechende Trypsinwerte siehe Eichkurve)

SK = Streptokinase

\+ = unbehandelte Fälle in Tabelle II

Wir versuchten festzustellen, welchen Trypsinmengen bzw. -Einheiten die bei der Methode nach DOWNIE und CLIFFTON gefundenen Extinktionsdifferenzen (in den Tabellen = d E_1 bzw. d E_2) entsprechen. Hierzu wurde nach der Versuchsbeschreibung vorgegangen und an Stelle des Plasminogen/Plasminniederschlages bekannte Mengen Trypsin zugefügt. Verwendet wurde ein Trypsinpräparat der Firma E. Merck für biochemische Zwecke mit 80 000 E/g.

Eichkurve.



Diskussion des Versuchsergebnisses:

Es fanden sich bei den Carcinompatienten Hämoglobinwerte im Serum, die alle bis auf einen unter 2 liegen, über die Hälfte sogar unter 1. Dies entspricht den Angaben GASCHLERs und bedeutet demnach Krebs oder Krebsschutz sehr gering. Der Mittelwert beträgt 0,98. Bei den unbehandelten, d.h. nicht bestrahlten Patientinnen ergab sich kein auffälliger Unterschied der Werte. Das bedeutet, dass durch die Bestrahlung keine mit dieser Methode erfassbare Änderung der proteolytischen Aktivität des Blutes auftrat.

Die Werte nach Zentrifugieren liegen alle wesentlich niedriger. Der Mittel-

wert beträgt hier 0,21. Diese Abänderung entspricht nicht der Originalvorschrift GASCHLERs. Wir gingen dabei von der Überlegung aus, dass durch proteolytische Fermente auch Erytrocyten angegriffen werden können und Hämoglobin freigelegt wird. Dadurch sollte die Ungenauigkeit durch das mechanische Herauslösen von Erytrocyten beim Abtrennen des Blutkoagels von der Glaswand und dem Umschütteln etwas eingeschränkt werden.

Bei den gesunden Versuchspersonen sind die Hb-Werte insgesamt etwas höher, jedoch bis auf 2 von 18 Fällen alle unter 2, was nach GASCHLER ebenfalls Krebs oder sehr geringen "Krebsschutz" anzeigen würde. Der Mittelwert beträgt hier 1,43. Da es sich bei den Versuchspersonen um sicher gesunde Menschen handelt, müssten nach GASCHLER die Werte alle über 3 liegen. Ein methodischer Fehler kann ausgeschlossen werden, da wir genau nach Vorschrift vorgingen und auch Parallelversuche durchführten. Daraus ergeben sich zwei Schlussfolgerungen:

1. Die von GASCHLER angegebenen Grenzewerte (normal - über 3, Krebs oder Krebsschutz sehr gering - unter 2, sicheres Carcinom - unter 1) sind zu revidieren oder
2. Die GASCHLERschen Werte sind reell; dann aber kann mit diesem Test keine Aussage über das Vorliegen eines malignen Prozesses gemacht werden.

Die gleichzeitige Plasminogen/Plasminbestimmung im Serum ergab ebenfalls keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Der Wert liegt sogar bei Carcinomfällen bei Aktivierung mit Streptokinase durchschnittlich höher (Mittelwert 0,98), als bei den gesunden Versuchspersonen (0,79). Dies würde den Ergebnissen von DILLARD und CHANUTIN (l.c.) entsprechen, die im Plasma von Carcinompatienten eine Erhöhung von Proteolysin und daneben auch eine Erhöhung des Trypsininhibitors fanden. Letzteres stellten auch CLARK, CLIFFTON und NEWTON (25) fest. Sie nehmen eine hohe Korrelation zwischen der Erhöhung der antiproteolytischen Aktivität des Serums und dem Vorliegen eines malignen Tumors an. Über die antiproteolytische Aktivität des Serums können wir mit unseren Versuchen keine Aussage machen. GREUER und Mitarbeiter (26) fanden dagegen, dass die Höhe des Plasminogenspiegels auch bei fortgeschrittenen Malignomen nicht von der Norm abweicht.

Bei einem Vergleich der Hb-Werte (Gaschler-Test) und der Plasminogen/Plasminwerte zeigt sich keine Korrelation in dem Sinne, dass hohe Werte der Erytrocytenfreilegung einer hohen fibrinolytischen Aktivität des Serums entspräche. Thrombolyse (in vitro) und fibrinolytische bzw. proteolytische Aktivität im Serum laufen nicht parallel.

Der Test nach GASCHLER ist nach unseren Versuchen ungeeignet zur Messung der proteolytischen Aktivität des Serums. Er scheint uns eher zuständig für

eine Beurteilung thrombolytischer Vorgänge. Als Suchtest für die Carcinomdiagnostik befriedigt er nicht, weil trotz sorgfältiger Beachtung der Originalvorschrift die Normalfälle falsche, und zwar zu niedrige Werte liefern. Die Reproduzierbarkeit lässt zu wünschen übrig.

II.

BEITRÄGE ZUR FRAGE DER BEEINFLUSSBARKEIT VON IMPFTUMOREN BEI MÄUSEN DURCH PROTEOLYTISCHE FERMENTE

Die lokale Therapie mit proteolytischen Fermenten bei Verbrennungen und bei oberflächlichen, mit Nekrosen einhergehenden Prozessen der Haut und Schleimhäute wird bereits lange Zeit erfolgreich durchgeführt. Seit einigen Jahren wird ausserdem auch eine Allgemeinbehandlung bei Traumen und chirurgischen Eingriffen vorwiegend mit Chymotrypsin und Papain vorgeschlagen. MONNINGER (27), BOGNER und CLIFFORD (28) und COLLMAN und Mitarbeiter (29) erzielten durch hohe Dosen eines peroral verabreichten Chymotrypsinpräparates eine deutliche Verringerung von Entzündung, postoperativen und posttraumatischen Ödemen und eine Beschleunigung des Heilverlaufes. Da, wie KABAKOFF und Mitarbeiter (30) nachweisen konnten, Chymotrypsin in einer enzymatisch aktiven Form vom Magen-Darm-Trakt resorbiert wird, ist diese Anwendungsweise der parenteralen vorzuziehen, um die bisweilen im Bereiche der Injektionsstelle auftretenden unerwünschten Nebenwirkungen zu vermeiden. Ebenfalls eine deutliche Herabsetzung des postoperativen Ödems und eine Verkürzung der Heilungsdauer erreichte POLLACK (31) durch orale Anwendung von Papain. Die Wirkungsweise dieser pflanzlichen Protease, die selbst nicht resorbiert wird, ist nach INNERFIELD und WERNIK (32) wahrscheinlich eine indirekte durch Aktivierung von Plasminogenvorstufen oder Aktivatoren. Proteolytische Enzyme haben somit einen neuen Anwendungsbereich in der Allgemeinbehandlung von traumatischen Ödemen und Entzündungen.

Auf der Suche nach einem Mittel zur Beeinflussung maligner Wachstumsprozesse wurden diese auch hierbei angewendet. Bereits 1906 gaben SHAW und MACKENZIE (33) eine "Krebskur" an, bei der den Kranken eine Trypsin-Glyzerinlösung peroral gegeben und gleichzeitig in das den Tumor umgebende Gewebe injiziert wurde. Zur gleichen Zeit stellte BEARD (34) eine tumorreduzierende Wirkung des Trypsin bei Mäusen mit Jensentumoren fest und berichtet

über Besserungen und Heilungen mit Trypsininjektionen bei Menschen (35). Da die Misserfolge jedoch überwogen, wurden diese therapeutischen Versuche nach wenigen Jahren wieder verlassen. Nach über 40 Jahren wurde das Interesse an der Trypsinbehandlung von Malignomen wieder neu geweckt. Anregend waren hierfür die Vorstellungen GASCHLERs (l.c.), dass ein manifestes Tumorwachstum nur möglich sei bei einem Mangel an proteolytischen Fermenten, die an sich die Aufgabe hätten tote und entartete Zellen aufzulösen. Bei chronischen Reizzuständen durch Einwirkung von chemischen, physikalischen oder belebten Noxen, die allgemein als Mitursache der Carcinomentstehung gelten, soll es nach GASCHLER allmählich zu einem Mangel an proteolytischen Fermenten im Blut kommen und daraufhin erst eine ungehemmte Zellwucherung möglich werden. Die Malignomzellen sollen während der überstürzten Mitosen ungeschützt sein gegen das Eindringen von proteolytischen Fermenten, welche diese dann aufzulösen vermögen. Von diesen Vorstellungen ausgehend stellt GASCHLER neben die allgemein gebräuchlichen Methoden der Krebsbehandlung, wie chirurgische Entfernung, Bestrahlung und cytostatische Therapie, die parenterale Anwendung von proteolytischen Fermenten. Hierzu verwendet er ein Fermentgemisch mit Bestandteilen von Rinderpankreas, Kalbsthymus, Pisum sativum, Lens esculenta und Papayotin. Es wird vorwiegend intramuskulär oder wenn möglich intratumoral, daneben aber auch oral, rectal, vaginal oder lokal angewendet. Neben GASCHLER berichten auch andere Autoren (24, 25) über gute Erfolge mit dieser Behandlung, d.h. es kam zum Stillstand des Geschwulstwachstums, bisweilen wurde eine fortschreitende Schrumpfung und Verkleinerung beobachtet und keine neuen Metastasen traten in Erscheinung. Daneben soll das Präparat auch unterstützend bei Operation und Bestrahlung wirken und einen guten Schutz vor Rezidiven bieten. Diese Befunde werden durch Angaben über Tierversuche unterstützt. So beobachtete ROSANOVA (36), WOLF (l.c.) und andere (37) eine Verkleinerung der Tumormassen bei Mäusen und Ratten nach mehrmaligen Injektionen dieses Fermentgemisches. Teilweise wurde vollständiges Verschwinden des Tumors erreicht. Die Überlebenszeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren war insgesamt wesentlich höher.

Die erste Annahme, dass bei carcinomtragenden Patienten ein Mangel an proteolytischen Fermenten im Serum vorliege, können wir, wie im I. Teil an Hand der Plasminogenbestimmungen ausgeführt wurde, nicht stützen. Kann nun durch eine parenterale oder enterale Gabe von proteolytischen Fermenten eine Erhöhung der proteolytischen Aktivität des Blutes erreicht werden? Es ist denkbar, dass die injizierten Fermente im Organismus sofort durch Inhibitoren unwirksam gemacht werden. CLARK und Mitarbeiter (l.c.) fanden, dass die antiproteolytische Aktivität im Serum bei 75 % von Malignomträgern erhöht ist.

Sie untersuchten hierzu die Verdauungshemmung durch Serumverdünnungsreihen von bekannten Fibrinogenmengen mit bekannten Trypsinmengen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen CLIFFTON und YOUNG (38). Andererseits konnte, wie oben erwähnt wurde, nachgewiesen werden, dass Chymotrypsin auch bei enteralen Anwendung in einer enzymatisch aktiven Form resorbiert wird. Injiziertes Trypsin entfaltet ebenso eine entzündungshemmende Wirkung. Daraus kann geschlossen werden, dass auch das Fermentgemisch GASCHLERs im Organismus wirksam werden kann. Ob allerdings die proteolytischen Enzyme die von ihm angegebene Schlüsselstellung in der Krebsentstehung besitzen und durch ihre Anwendung eine Heilung möglich ist, sei in Frage gestellt.

Auf dem Deutschen Krebskongress im Feb. 1966 in München wurden diese Probleme wieder aufgeworfen und insbesondere die Möglichkeit einer Hemmung der Metastasierung sehr positiv diskutiert. Hierzu berichtete z.B. NASEMANN von seinen an der Münchner Dermatolog. Univ. Klinik durchgeführten Therapieversuchen bei metastasierten Melanomalignomen mit diesem Fermentgemisch. Es konnte zwar kein absoluter Stop des Absiedlungsprozesses beobachtet werden, aber eine Reduktion der Metastasierung, sowohl in der Zahl, als auch in der Grösse der Einzelelemente. Ebenso wies SCHMÄHL in seinem Vortrag über die experimentellen Grundlagen der Tumormetastasierung auf die grosse Bedeutung der proteolytischen Enzyme, wie Fibrinolysin, hin, durch deren Applikation die Angehrate von Metastasen verringert werden kann.

Diese in neuester Zeit wieder aktuellen Fragestellungen veranlassten uns, unsere Versuche zur Behandlung von Impftumoren mit proteolytischen Fermenten in der vorliegenden Dissertation zu veröffentlichen. Wir prüften zunächst den Plasminogen/Plasminspiegel im Laufe des Tumorwachstums, dann die Beeinflussbarkeit von Ascitestumoren und solid wachsenden Tumoren bei Mäusen durch Injektionen von proteolytischen Fermenten und schliesslich die Aktivität der Serum-Laktat-Dehydrogenase (SLDH) bei SA-I-infizierten Mäusen vor und nach Behandlung mit Fermentgemischen. Dieses Ferment haben wir deshalb gewählt, weil es nach Übertragung des Tumors auf die Versuchstiere zu einer charakteristischen Vermehrung der Aktivität kommt. Diese Aktivität kommt zustande durch die Zunahme während des Tumorwachstums, Freilegung aus den Zellen, Übertritt in das Serum. Ferner ist diese ursächlich bedingt durch ein Virus (Ryley-Virus) welches mit dem Tumor gleichzeitig auftritt und sich vermehrt, den Organismus infizierend und gleichzeitig die LDH-Aktivität erhöhend. Beide Vorgänge, dies war unsere Überlegung, könnten prinzipiell durch ein proteolytisches Fermentgemisch beeinflussbar sein und die SLDH-Erhöhung wäre ein Ausdruck für die Wirkung der Fermente.

Zur Methodik

Blutentnahme:

Das Blut von Mäusen wurde gewonnen durch Punktion von Retroorbitalvenen mit spitz ausgezogenen, gebogenen Glaskapillaren an mit Äther narkotisierten Tieren. Nach Retraktion und anschliessender Zentrifugierung bei 3000 U/min etwa 8-10 min lang wird das überstehende Serum weiter verwendet. Da die so gewonnenen Serummengen gering sind, wandelten wir die im I. Teil beschriebene Plasminogen/Plasminbestimmung nach DOWNIE und CLIFFTON in eine Mikromethode wie folgt um:

Mikromethode:

0,05 ml Serum werden in ein kleines Zentrifugenglas gegeben und mit 0,95 ml verdünnter Essigsäure versetzt. Nach Zentrifugieren (15 min bei 2500 U/min) erhält man einen deutlichen Niederschlag am Boden des Glases und der Überstand lässt sich gut abgiessen. Der Niederschlag wird in 0,05 ml Veronalpuffer gelost. Dazu gibt man 0,02 ml Streptokinase (= 20 E), 0,03 ml Veronalpuffer und 0,5 ml Caseinlösung, bzw. 0,05 ml Puffer und 0,5 ml Caseinlösung für den streptokinasefreien Ansatz. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37°C wird mit 1,2 ml Trichloressigsäure das ungespaltene Eiweiss gefällt und 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Ein frischer Ansatz aus Casein, Serumniederschlag und Puffer wird sofort mit Trichloressigsäure versetzt und als 0-Stunden-Wert verwendet. Vom klaren Überstand gibt man je 1,25 ml zu 2,5 ml NaOH und 0,75 ml Phenolreagens. Nach 10 min wird die Extinktionsdifferenz des 48-Stunden-Wertes gegen den 0-Stunden-Wert abgelesen. Die einzelnen Substanzen werden so verwendet, wie im I. Teil angegeben ist. Die Brauchbarkeit dieser Methode wurde zunächst an menschlichen Seren untersucht, von denen gleichzeitig eine Bestimmung nach der ursprünglichen Methode durchgeführt wurde. Es ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung der Werte.

1. Plasminogen/Plasminbestimmung bei Mäusen im Laufe des Wachstums eines Ascitestumors

In Vorversuchen fanden wir, dass Mäuseserum eine geringe, aber deutliche Caseinspaltung zeigt, die durch Streptokinase nicht aktivierbar ist. Ansätze nach der gleichen Methode mit Ascitesserum eines Tumorascites ergaben ebenfalls eine deutliche, durch Streptokinase nicht aktivierbare Caseinspaltung. Etwa doppelt so hohe Werte fanden wir bei Verwendung von Asciteszellenhomogenat

Nun prüften wir die Caseinspaltung durch Mäuseserum im Verlaufe des Tumorwachstums. Die Tumorübertragung wurde folgendermassen durchgeführt: Eine Maus mit deutlich erkennbarem Ascitestumorwachstum wurde getötet, die Bauchhaut vorsichtig abgezogen ohne Eröffnung der Bauchhöhle und mit einer sterilen Spritze der Ascites entnommen. Davon wurde den Versuchstieren je 0,5 ml intraperitoneal injiziert. Die Angehrate dieses Tumors beträgt nahezu 100 %. Zur Übertragung eignet sich am besten ein milchig trüber Ascites. Die Überlebenszeit beträgt durchschnittlich 13-14 Tage.

Versuch a:
Verwendung von 10 gesunden Mäusen. Tumorübertragung durch intraperitoneale Injektion von Ascites. 5 Tage danach war der Tumor bei allen Tieren deutlich feststellbar.

Versuch b:
Verwendung von 7 gesunden Mäusen. Tumorübertragung wie bei Versuch a.

Die Werte der Caseinspaltung sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Erläuterungen zu den Abkürzungen siehe oben, I. Teil.

TABELLE III
Die proteolytische Aktivität des Serums, bestimmt durch die Caseinspaltung im Laufe des Wachstums eines Ascitestumors.

Protokoll Nr.	Anfangswert		5. Tag		8. Tag		12. Tag		15. Tag	
	d E		d E		d E		d E		d E	
	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK
a										
1	0,16		0,12	0,23	0,17	0,21	0,14	0,19	0,12	
2	0,17		0,14		0,15		0,15	0,12	0,19	0,16
3			0,13		0,16		0,16	0,15	0,21	0,17
4	0,16		0,12		0,19	0,16	0,17			
5			0,14	0,16	0,18	0,23	0,16			
6	0,18		0,48		0,23	0,22				
7	0,87		0,13							
8	0,14		0,15							
9	0,18		0,14							
10	0,13	0,16	0,13							
Mittelwert	0,16 (o. 7)		0,17		0,18		0,16		0,17	
Zahl d. überl. Tiere	10		10		6		5		3	

Protokoll Nr.	Anfangswert		2. Tag		6. Tag		8. Tag	
	d E		d E		d E		d E	
	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK
b								
1	0,12	0,05	0,24		0,22		0,18	
2			0,4		0,24		0,26	
3	0,16		0,35	0,36	0,22		0,27	
4	0,12	0,03					1,4	0,35
5	0,14	0,13	0,31	0,35	0,29		0,32	0,52
6	0,21	0,21	0,25		0,28		0,38	0,18
7	0,12				0,19			
Mittelwerte	0,15		0,31		0,24		0,28 (ohne 4)	
Zahl der Tiere	7		7		7		6	

Ergebnis:

Im Verlauf der Tumorentwicklung ist bei Versuch a keine Änderung des Plasminogen/Plasminspiegels, geprüft an der Caseinspaltung, erkennbar. Bei Versuch b liegt der Anfangswert vor Tumorübertragung niedrig wie bei a, die Werte vom 2.-8. Tag danach sind deutlich erhöht, aber nicht fortlaufend.
Die Caseinspaltung ist durch Streptokinase nicht aktivierbar. Kritisch betrachtet könnte dazu eingewandt werden, dass es sich nicht sicher um die Erfassung des Plasmin handelt, sondern einfach um Serumproteasen.

2. Plasminogen/Plasminbestimmung (bzw. Caseinspaltung) und Therapie mit proteolytischen Fermenten bei Tumormäusen

a) Subcutane Tumorinjektion und subcutane Injektion der Fermente

Zur Tumorübertragung wurde steriler, frischer Ascites entnommen und den Kontroll- und Versuchstieren je 0,3 ml subcutan am Rücken injiziert, um die solid wachsende Form des Tumors zu erzeugen. Insgesamt wurden 35 gesunde Mäuse verwendet, davon 20 als Versuchstiere und 15 als Kontrolltiere. Zur Therapie wurde ein Gemisch von proteolytischen Fermenten aus fraktionierten Hy-

drolysaten mit folgender Zusammensetznng verwendet: Rinderpankreas 8 mg, Kalbsthymus 4 mg, Pisum sativum 4 mg, Lens esculenta 4 mg, Papayotin 2 mg und Trägersubstanz ad 100 mg. 1 Ampulle mit 100 mg wurde in 2,5 ml sterilem Aq.bidest gelöst und den Versuchstieren je 0,3 ml s.c. in die Gegend der Tumorinjektion gespritzt. Wir sind der Firma Mugos-Emulsionsgesellschaft für die Unterstützung unserer Arbeit, durch Überlassung schöner, wirksamer Fermentpräparate zu grossem Dank verpflichtet.
Die 1.Injektion erfolgte 3 Tage nach Tumortransplantation, die weiteren mit gleicher Menge im Abstand von 6 Tagen, insgesamt 5. Den Kontrolltieren wurde, um einen unspezifischen Reiz auf den Tumor auszuschliessen, jeweils 0,3 ml Lösungsmittel entsprechend injiziert. Zwischendurch wurde mehrmals Blut entnommen zur Prüfung der Caseinspaltung. Die 2.Blutentnahme erfolgte 2 Stunden nach der 2.Fermentinjektion, um festzustellen, ob diese unmittelbar eine Erhöhung der proteolytischen Aktivität des Serums bewirkt und eine Erhöhung der Caseinspaltung eintritt.

Die Tumoren entwickelten sich sehr langsam, sowohl bei den Versuchs-, als auch bei den Kontrolltieren und waren nach einem Monat durchschnittlich etwa erbsgross. Die Versuchstiere bekamen an der Injektionsstelle teilweise einen blutig verkrusteten Bezirk, die Kontrolltiere nicht. 38 Tage nach der Tumortransplantation überlebten noch 3 Versuchstiere und alle Kontrolltiere. Letztere sahen wesentlich kräftiger und frischer aus als die behandelten Tiere. Bei der Sektion konnten keine auffälligen makroskopischen Veränderungen festgestellt werden.
In nachfolgender Tabelle finden sich die Werte der Caseinspaltung.

TABELLE IV

Caseinspaltung bei Mäusen mit solid wachsendem Tumor, mit und ohne Behandlung mit proteolytischen Fermenten

Protokoll Nr.	Anfangswert		8. Tag		16. Tag		30. Tag		37. Tag	
	d E		d E		d E		d E		d E	
	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK
V										
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,14	-	0,22	-	0,20	-	-	-	-	-
3	-	-	0,22	0,34	0,19	-	0,13	-	-	-
4	0,28	-	0,24	0,29	0,23	-	0,22	-	-	-
5	-	-	0,22	-	0,49	0,34	0,40	-	-	-
6	0,17	-	0,25	-	0,29	-	0,12	0,39	-	0,30
7	0,22	0,32	-	-	0,36	-	-	-	0,18	0,24
8	-	-	0,24	-	-	-	0,14	0,37	-	0,36
9	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,14	-	0,30	-	0,28	-	-	-	-	-
11	0,18	-	0,28	0,27	0,29	0,27	0,12	0,06	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0,14	0,15	0,2	0,2	0,35	-	0,3	-	0,42	0,36
14	-	-	-	-	0,35	-	-	-	-	-
15	1,2	0,33	0,3	0,29	0,21	-	-	-	-	-
16	0,28	0,3	0,31	-	1,2	0,45	-	-	-	-
17	0,24	0,3	0,24	-	0,14	0,19	0,19	0,2	-	-
18	-	-	0,31	0,3	0,2	-	-	-	-	-
19	0,52	-	0,32	-	0,23	-	-	-	-	-
20	-	-	0,23	0,26	-	-	0,1	0,35	-	-
K										
1	0,11	-	0,21	-	0,21	0,28	0,2	0,26	-	-
2	0,19	-	0,34	0,39	0,27	-	-	-	-	0,33
3	-	-	-	-	-	-	0,63	0,23	0,3	0,32
4	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0,16	-	-	-	0,32	-	-	-	0,36	0,4
6	-	-	0,39	0,4	0,3	-	-	-	0,3	0,34
7	0,15	-	0,31	0,4	0,44	-	0,29	-	-	0,33
8	-	-	0,27	-	0,64	0,9	0,29	0,25	0,33	0,3
9	0,13	-	0,3	-	0,65	0,38	-	-	0,35	0,4
10	0,19	-	0,26	-	-	-	0,24	0,26	-	0,27
11	0,15	0,15	0,27	-	0,45	0,39	0,32	0,3	-	0,4
12	0,14	-	0,37	0,37	0,35	-	-	-	-	-
13	0,15	0,11	0,28	-	-	-	-	-	-	0,29
14	0,6	-	0,27	0,26	-	-	0,2	0,7	-	-
15	0,16	0,15	-	-	0,3	-	0,68	0,28	0,38	0,32

Mittelwerte

	Anfangswert	8. Tag	16. Tag	30. Tag	37. Tag
V	0,32 ohne 15 0,26	0,265	0,32 ohne 16 0,24	0,20	0,30
K	0,19	0,34	0,42 ohne 8 0,36	0,34	0,34

V = Versuchstiere
K = Kontrolltiere

Ergebnis:

Durch die Injektion von proteolytischen Fermenten konnte bei Tumormäusen keine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden. Das Präparat scheint eher toxisch auf die Tiere gewirkt zu haben -vielleicht im Zusammenhang mit dem Tumor- da die damit behandelten Tiere früher starben, als die mit Lösungsmittel gespritzten Kontrolltiere.
Die proteolytische Aktivität des Serums, bestimmt durch die Caseinspaltung, stieg nach der Tumortransplatnation etwas an und blieb dann ziemlich konstant. Die subcutane Fermentinjektion hatte keinen Einfluss auf die Höhe der Caseinspaltung, da sich kein auffallender Unterschied in beiden Gruppen ergab. Es ist keine Aktivierung durch Streptokinase erkennbar.
Bei den behandelten Tieren konnte kein Rückgang oder Verschwinden des Tumors beobachtet werden.

b) Verwendung eines solid wachsenden Tumors und intratumorale Fermentinjektion

Tumortransplantation:

33 gesunden braunen Mäusen wurde je ein etwa linsengrosses Stück eines kurz vorher steril entnommenen Tumors (spontan aufgetretenes solides Mäusesarkom) übertragen. Hierzu wurde den mit Äther narkotisierten Tieren links seitlich ein 6-8 mm langer Schnitt in die Bauchhaut gelegt, mit einer Pinzette die Haut ringsum stumpf etwas unterfahren, in die so gebildete Tasche das Tumorstück übertragen und die Haut darüber mit einer Knopfnaht verschlossen. 17 Mäuse wurden als Versuchstiere und 16 als Kontrolltiere verwendet. Am 9. Tag nach der Transplantation war bei fast allen Tieren ein Tumorwachstum deutlich

feststellbar. Die durchschnittliche Überlebenszeit beträgt normalerweise 22-24 Tage.

Therapie:

Zur Behandlung wurde den Versuchstieren je 10 mg = 0,2 ml des Fermentpräparates intratumoral gespritzt (1 Ampulle zu 100 mg in 2,0 ml phys. NaCl gelöst). Die 1. Injektion erfolgte am 9. Tag nach der Tumortransplantation, die weiteren im Abstand von 2 bzw. 3 Tagen, insgesamt 8 mal. Den Kontrolltieren wurde jeweils 0,2 ml phys. NaCl-Lösung gespritzt.
In folgender Tabelle finden sich die Mittelwerte der Caseinspaltung.

TABELLE V
Caseinspaltung durch das Serum von Tumormäusen bei intratumoraler Behandlung mit proteolytischen Fermenten

	Anfangswert vor Tu-Transpl.	13. Tag (nach der 2. Inj.)	21. Tag (nach der 5. Inj.)
Versuchstiere	0,13	0,16	0,20
Kontrolltiere	0,10	0,15	0,17

Die Zahlen bedeuten die Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen d E (siehe Tabelle I).

Überlebenszeit

——— Versuchstiere
– – – – Kontrolltiere
↑ Fermentinjektion

Sektionsbefunde:

Die Tumoren nahmen im Verlaufe des Versuches konstant an Grösse zu und wurden bis durchschnittlich pflaumengross, sowohl bei den Versuchstieren, als auch bei den Kontrolltieren. Bei fast allen Versuchstieren fanden sich im Zentrum der Tumoren gelbliche, flüssig nekrotische Massen und am Rande festes, rötlich-graues Tumorgewebe. Die Tumoren der Kontrolltiere waren meist fest und rötlich-grau, nur bei den zuletzt gestorbenen mit verhältnismässig grossen Tumoren waren zentral geringe bröckelige Nekrosen. Im übrigen waren keine auffälligen Veränderungen an den sezierten Tieren festzustellen.

Gewichte der Tumoren

Wägung der Tumoren von gestorbenen Tieren im Verlaufe des Versuches

Tag nach Tumortranspl.	Gewichte der Tumoren in g	
	Versuchstiere	Kontrolltiere
12	0,38	0,59
	0,18	0,39
14	0,505	
16	0,33	
17		1,87
		0,61
21	1,45	3,5
22	2,2	1,7
		2,6
23	2,6	1,25
24	3,3	
26		2,79
		3,91
28	2,0	
Mittelwerte	1,44	1,92
Mittl. Fehler d. Einzelmess.	± 1,07	± 1,42
Mittl. Fehler d. Ergebnisses	± 0,36	± 0,45

Ergebnis:

Durch intratumorale Injektion von proteolytischen Fermenten konnte keine Verlängerung der Überlebenszeit bei Mäusen mit solid wachsenden Tumoren erreicht werden.

Durch die Injektionen kam es zu einer Verflüssigung der zentralen Abschnitte. Es wurde kein Wachstumsstillstand oder Rückgang von Tumoren beobachtet. Das durchschnittliche Tumorgewicht entspricht dem der Kontrolltiere, die Differenz der Mittelwerte liegt innerhalb der Fehlergrenze. 2 Tiere mit bereits grösseren Tumoren waren ganz plötzlich wenige Minuten nach einer Fermentinjektion gestorben.

Die Werte der Caseinspaltung nahmen im Laufe des Tumorwachstums ganz gering zu, es ist jedoch keine Beeinflussung durch die Behandlung erkennbar. Die Werte insgesamt liegen sehr niedrig und es zeigt sich keine Aktivierbarkeit durch Streptokinase.

c_1) Verwendung von Ascitestumor und intraperitoneale Fermentinjektion

Tumortransplantation:

27 gesunden weissen Mäusen wurde je 0,5 ml eines frischen, steril entnommenen Ascites intraperitoneal injiziert und dazu 15 als Versuchstiere und 12 als Kontrolltiere verwendet. Die Überlebenszeit beträgt normalerweise durchschnittlich 12-14 Tage. Am 5. Tag war bei allen Tieren ein deutlicher Ascites feststellbar.

Therapie:

Es wurden je 10 mg (100 mg in 2,0 ml phys. NaCl gelöst) des Fermentpräparates intraperitoneal injiziert, bzw. je 0,2 ml Lösungsmittel den Kontrolltieren. Die 1. Injektion erfolgte am 5. Tag nach Tumortransplantation, die weiteren im Abstand von 2 Tagen, insgesamt 4 mal.

Sektionsbefunde:

Bei den mit Fermenten intraperitoneal behandelten Ascitesmäusen fanden sich im Abdomen teils weissliche, teils mehr glasige, gallertähnliche Massen, die auf den Darmschlingen lagen und teilweise strangförmig dazwischen hinein reichten. Bei den Kontrolltieren waren keine derartigen Veränderungen feststellbar. Der histologische Schnitt aus diesen weisslichen Strängen zeigte fast rein zellige Strukturen, bestehend aus dicht gelagerten, verschieden grossen, intakten Zellen in einem feinen faserigen Netz. In einzelnen Bezirken fanden sich etwas eosinophile Schleimsubstanzen. Es darf angenommen werden, dass es sich bei den gallertigen Massen, in denen die Tumorzellen eingelagert waren, um Umwandlungsprodukte des Ascitesserumeiweiss handelte. Es ist ja bekannt, dass tryptische Fermente unter besonderen Bedingungen native Proteine abbauen und koagulieren. Insgesamt war bei den behandelten Tieren weniger Flüssigkeit in der freien Bauchhöhle und diese meist gering hämorrhagisch.

Die folgende Tabelle gibt die Werte der Caseinspaltung an.

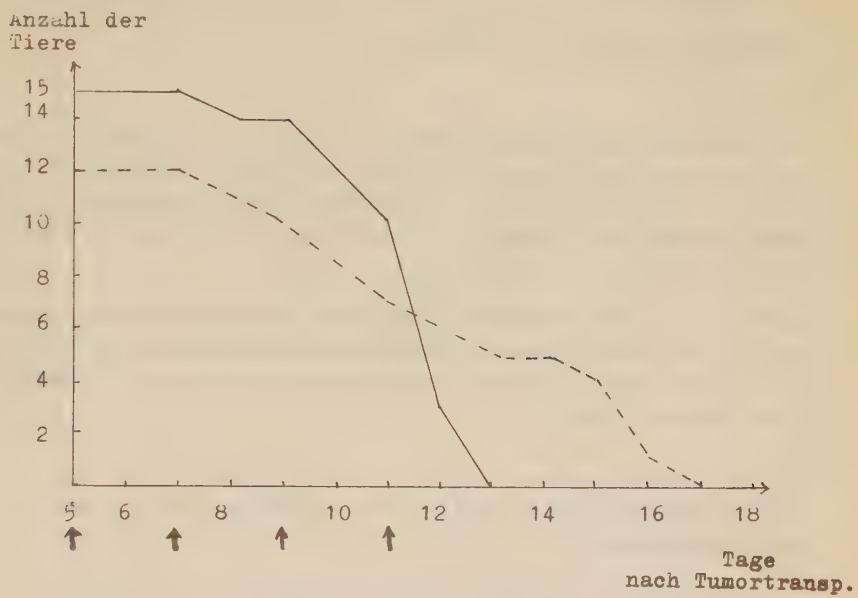
TABELLE VI

Caseinspaltung durch Serum von Mäusen mit Ascitestumoren bei intraperitonealer Fermentbehandlung

	Anfangswert		6. Tag		11. Tag	
	d E		d E		d E	
	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK
Versuchstiere	0,11	0,17	0,07	0,12	0,10	0,13
	0,17	0,15	0,10	0,13	0,10	0,13
	0,15	0,36	0,09	0,10	0,34	0,20
	0,55	0,18	0,13	0,11	(1,0)	0,12
	0,16	0,14	0,12		0,13	
	0,21		0,13		0,15	
	0,22					
	0,34					
	0,16					
	0,19					
Mittelwerte	0,23	0,20	0,11	0,12	0,16	0,14
Kontrolltiere			0,07	0,08	0,11	0,11
			0,09	0,18	0,08	0,10
			0,16		0,70	0,11
			0,12	0,49		
Mittelwerte	0,23	0,20	0,11	0,13	0,34	0,11

Zahlenbedeutung siehe Tabelle I.

Überlebenszeit



——— Versuchstiere
– – – Kontrolltiere
Fermentinjektion

Ergebnis:

Im Verlaufe des Wachstums eines Ascitestumors trat bei intraperitonealer Verabreichung von proteolytischen Fermenten, gegenüber den Kontrolltieren, keine auffallende Änderung der proteolytischen Aktivität des Serums, gemessen an der Spaltung von Casein, ein.
Durch die Behandlung wurde keine Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber unbehandelten Tieren erreicht, eher sogar eine Verkürzung.
Die Ascitesmenge war bei den behandelten Tieren insgesamt etwas geringer, aber leicht hämorrhagisch. Es hatten sich weissliche, gallertartige Stränge auf und zwischen den Darmschlingen gebildet.

c_2) Verwendung von Ascitestumor und intraperitoneale Verabreichung des Fermentpräparates

Tumortransplantation wie bei Versuch c_1.

Therapie:

Den Versuchstieren (16 Mäuse) wurden je 12 mg = 0,3 ml des Fermentpräparates (1 Ampulle zu 100 mg in 2,5 ml phys. NaCl gelöst) intraperitoneal injiziert und den Kontrolltieren (15) die gleiche Menge Lösungsmittel. Die 1. Injektion erfolgte am 2. Tag nach der Tumortransplantation und die weiteren im Abstand von 3 Tagen, insgesamt 3 mal.

Zur Bestimmung der Caseinspaltung wurde ein Mischserum von dem entnommenen Blut der Versuchs- bzw. Kontrolltiere verwendet. Von den Ansätzen mit Streptokinase wurden jeweils 2 Parallelansätze vorgenommen. Die Werte finden sich in folgender Tabelle.

TABELLE VII
Caseinspaltung durch Serum von Mäusen mit Ascitestumor bei intraperitonealer Fermentbehandlung

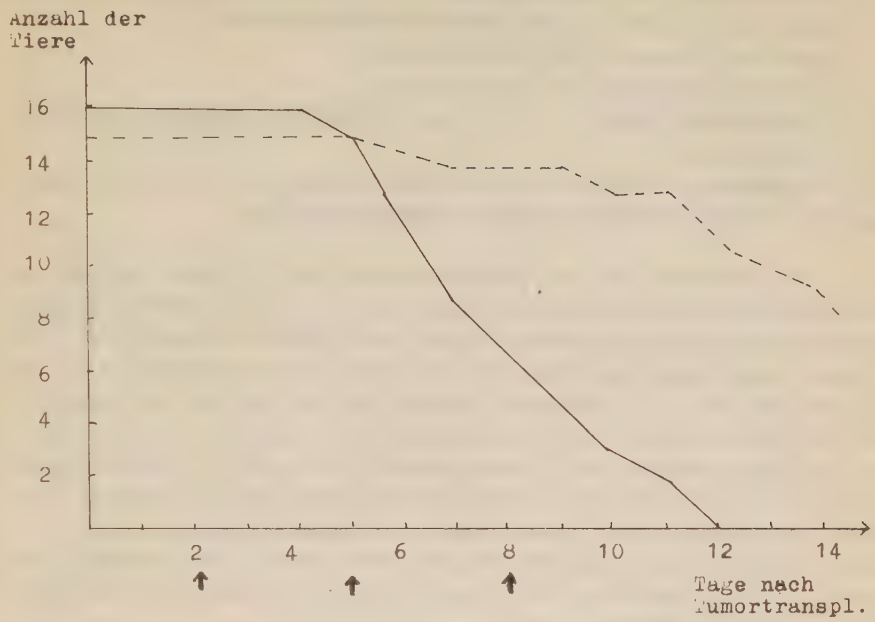
	Anfangswert		3. Tag		7. Tag	
	d E		d E		d E	
	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK	mit SK	ohne SK
Versuchstiere	0,33	0,27	0,27	0,22	0,28	0,18
	0,30		0,28		0,24	
Kontrolltiere	0,33	0,27	0,26	0,21	0,28	0,17
	0,30		0,29		0,25	

Zahlenbedeutung siehe Tabelle I.

Sektionsbefunde:

Der Ascites war in beiden Gruppen unauffällig, teilweise gering hämorrhagisch. Es fanden sich keine gallertartigen Massen und Strangbildungen wie bei Versuch c_1.

Überlebenszeit:



——— Versuchstiere
– – – Kontrolltiere
↑ Fermentinjektion

Ergebnis:

Die proteolytische Aktivität, gemessen an der Caseinspaltung durch das Serum, konnte durch intraperitoneale Fermentinjektionen nicht beeinflusst werden. Die kleinen Schwankungen im Verlaufe des Tumorwachstums entsprechen denen der Kontrolltiere. Die Spaltungen insgesamt sind gering. Eine Aktivierbarkeit durch Streptokinase liegt nicht vor.
Eine Verlängerung der Überlebenszeit konnte durch die Behandlung nicht erreicht werden. Die Versuchstiere starben durchschnittlich früher als die Kontrolltiere. Der Ascites zeigte keine auffälligen Veränderungen durch die Behandlung.

Bei den beschriebenen Therapieversuchen kam es im Durchschnitt zu einer geringen, aber deutlichen Verkürzung der Überlebenszeit der behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren. Für die Bedeutung dieses Effektes

gibt es verschiedene Möglichkeiten.

1. Schädigung der Tiere durch toxische Spaltprodukte aus nekrotischen Tumormassen, insbesondere bei intratumoraler Fermentinjektion.
2. Zusätzliche Aktivierung des Tumorwachstums.
3. Organschädigung durch das Fermentgemisch.
4. Anaphylaktische Reaktion, da es sich um mehrmalige Injektion von Fremdeiweiss handelt.

Eine Verwendung zu hoher Dosen dürfte ausgeschlossen werden, da die Mengenangaben der oben angeführten Autoren eingehalten wurden.

Um weitere Einflüsse des Fermentgemisches auf den Stoffwechsel von tumortragenden Versuchstieren zu erkennen, führten wir Aktivitätsbestimmungen der Serumlaktatdehydrogenase (SLDH) bei SA-I-infizierten Mäusen durch. Mit diesem Tumor wächst vergesellschaftet ein Virus, nach dem Entdecker und Bearbeiter als Ryley-Virus bezeichnet, welches die Aktivität der SLDH mehrfach über die Norm ansteigen lässt. Da nun WOLF (l.c.) zeigen konnte, dass auch die Aktivität von Viren durch Fermentgemische vermindert, ja vielleicht sogar zerstört werden kann, lag es nahe einen Versuch auch am Ryley-Virus zu machen. Wir sahen in dieser Virusart deswegen ein günstiges Objekt, weil die SLDH einen Indikator für die Aktivität des Virus darstellt. Das Absinken der SLDH-Werte nach einer geglückten Behandlung wäre dann ein Ausdruck für die Hemmung des Viruswachstums.

3. Das Verhalten der SLDH bei SA-I-infizierten Mäusen nach Behandlung mit proteolytischen Fermenten

Versuchsanordnung

15 Tieren wurde je 0,5 ml zellfreier Ascites von SA-I-Tumortieren intraperitoneal injiziert. 24 Std. nach Infektion wurden 10 Tieren (Tier Nr.5-15) 8 Tage lang täglich 0,2 ml (= 10 mg) des Fermentpräparates i.p. injiziert. Die Tiere 1-5 wurden nicht behandelt und als Kontrolle verwendet. Zur Bestimmung der SLDH wurde im Abstand von 2 Tagen Blut entnommen. Der Anfangswert wurde 24 Std. nach Tumorübertragung, vor der 1.Fermentinjektion bestimmt.

SLDH-Mittelwerte im Laufe des Versuches

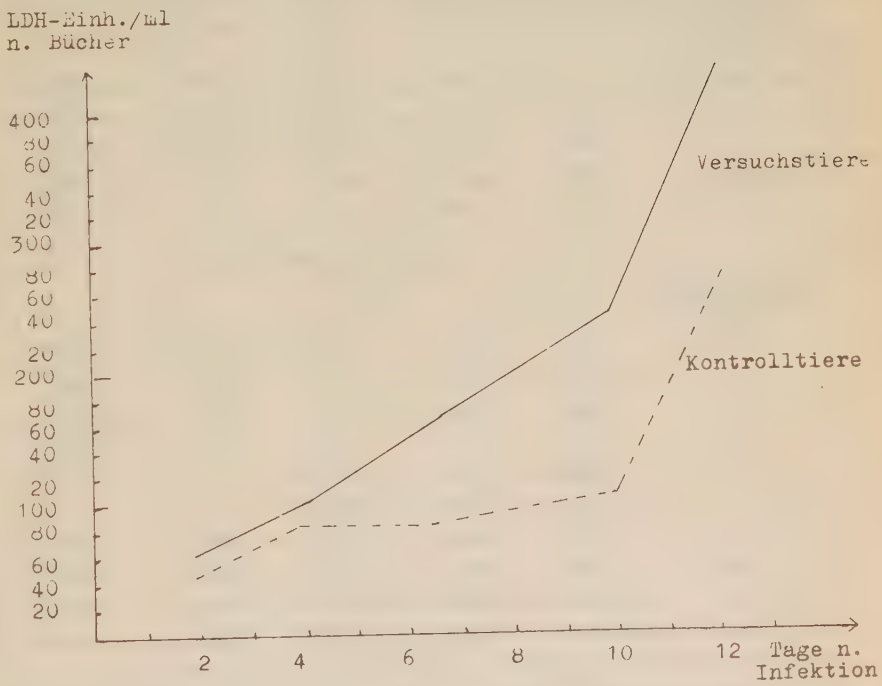


TABELLE VIII

SLDH-Werte bei SA-I-infizierten Mäusen mit und ohne Behandlung mit proteolytischen Fermenten

Versuchstag	2. Tag	4. Tag	6. Tag	10. Tag	12. Tag
Kontrolltiere					
Nr.					
1	40	75	76	135	265
2	32	80	76	72	298
3	(106)	(73)	(80)	(142)	(123)
4	44	88	68	93	380
5	68	90	96	160	168
	m = 46	m = 84	m = 84	m = 115	m = 277
Versuchstiere					
Nr.					
6	74	100	128	270	418
7	56	85	114	150	445
8	58	98	132	318	395
9	54	95	120	202	550
10	(244)	(231)	(398)	+	+
11	74	93	168	+	+
12	62	105	213	233	633
13	68	75	190	350	345
14	52	120	178	300	335
15	66	115	125	145	340
	m = 63	m = 98	m = 152	m = 246	m = 433

Die Zahlen bedeuten LDH-Einheiten nach Bücher.
m = Mittelwerte

Sektionsbefunde:

Bei den Kontrolltieren war eine grössere Menge Ascites zu beobachten, der ausnahmlos nicht hämorrhagisch war, im Gegensatz zu den mit proteolytischen Fermenten gespritzten, deren Ascites mehr oder minder stark hämorrhagisch war und höchstens 5 ml betrug. Dafür fand sich bei den Versuchstieren verbreitertes solides Tumorwachstum in der Bauchhöhle, auf und zwischen den Darmschlingen; dazwischen auch wieder gelatinöse Massen. Die Einstichstellen waren überall weisslich käsig.

Ergebnis:

Unbehandelte (Kontrolltiere) und mit proteolytischen Fermenten behandelte (Versuchstiere) Tiere verhielten sich bis zum 4. Versuchstag gleich. Ab dem 6. Tag konnten bei den behandelten Tieren im Durchschnitt doppelt so hohe Wertanstiege der SLDH beobachtet werden als bei den Kontrolltieren. Für die Erklärung dieses Ergebnisses muss man mehrere Möglichkeiten erwägen:

1. SLDH-Anstieg durch Zerfall der Tumorzellen bei Einwirkung der Fermente.
2. SLDH-Anstieg durch Schädigung von Organen infolge Fermentbehandlung.
3. SLDH-Anstieg durch Verletzung von Blutgefässen oder Organen bei Injektion der Fermente in die Bauchhöhle.
4. Durch die Fermente verursacht, eine gehemmte Inhibition der freigesetzten SLDH oder eine verhinderte Clearance.

3b. Das Verhalten der SLDH bei Ascitesmäusen und gesunden Mäusen bei Behandlung mit proteolytischen Fermenten

Versuchsanordnung:

Verwendung von insgesamt 30 Tieren, die in 3 Gruppen (A, B, C) zu je 10 Tieren geteilt wurden. Den Tieren der Gruppe A und B wurden je 0,5 ml Ascites intraperitoneal injiziert, die Gruppe C wurde nicht infiziert. 24 Std. danach wurden die Tiere der Gruppe A und C täglich mit 0,2 ml (= 10 mg) des Fermentpräparates i.p. gespritzt, insgesamt 9 mal. Den Tieren der Gruppe B wurde jeweils 0,2 ml phys. NaCl-Lösung gespritzt. Zur Bestimmung der SLDH wurde jeden 2. Tag von allen Tieren Blut abgenommen und von jeder Gruppe ein Mischserum verwendet. Der Anfangswert wurde 24 Std. nach der Tumortransplantation und vor der 1. Fermentinjektion bestimmt.

SLDH-Mittelwerte im Laufe des Versuches

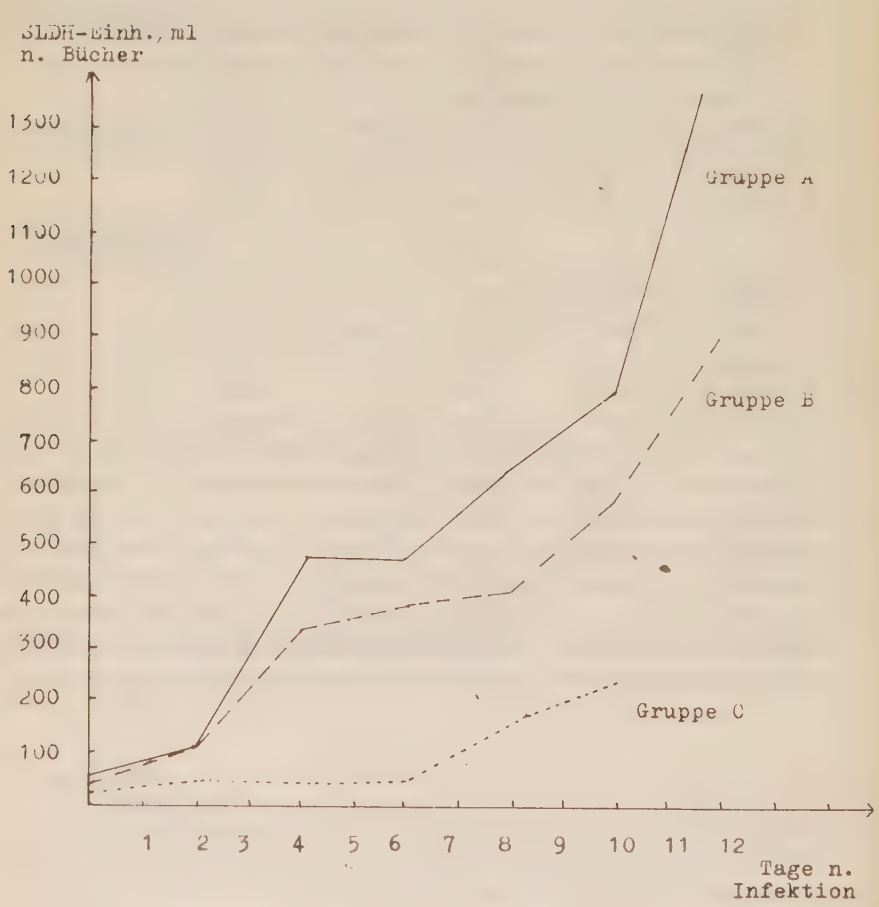


TABELLE IX

SLDH-Werte bei Ascitesmäusen und gesunden Mäusen bei Behandlung mit proteolytischen Fermenten

Tiergruppe	Anfangswert	2. Tag	4. Tag	6. Tag	8. Tag	10. Tag	12. Tag
A	60	116	477	470	638	796	1470
B	56	116	333	378	412	590	902
C	28	48	47	52	157	242	+

Die Zahlen bedeuten SLDH-Einheiten nach Bücher.

Sektionsbefunde:

In der Gruppe B (Tumor mit Injektion von phys. NaCl) fand sich bei allen Tieren reichlich Ascites, der bei 3 Tieren gering hämorrhagisch war. Die Einstichstellen waren unauffällig. Bei Gruppe A (Tumor mit Fermentinjektion) war wesentlich weniger Ascites feststellbar, der aber bei fast allen Tieren gering hämorrhagisch war. Es fand sich kein verbreitertes Tumorwachstum über den Bauchorganen. Die Einstichstellen waren weisslich nekrotisch. Bei Gruppe C (Normaltiere mit Fermentinjektion) waren keine Veränderungen erkennbar. Möglicherweise waren die Tiere infiziert worden, da alle im Verlaufe des Versuches starben.

Ergebnis:

Bei behandelten Tumortieren konnten ab dem 4. Versuchstag etwa 1/3 höhere Wertanstiege gegenüber den unbehandelten Tieren beobachtet werden. Bei den behandelten Normaltieren kam es ab dem 6. Tag zu einem starken Wertanstieg bis 242 E am 10. Tag. Für den SLDH-Anstieg bei Normaltieren gibt es folgende Möglichkeiten zur Erklärung:

1. SLDH-Anstieg durch Organschädigung nach Fermentbehandlung.
2. SLDH-Anstieg durch lokale Schädigung bei der Injektion.
3. Infektion der Tiere, die nicht mit der Fermentbehandlung in ursächlichem Zusammenhang steht.

Zur Klärung, ob die Behandlung mit proteolytischen Fermenten einen SLDH-Anstieg bewirkt oder ob dieser eine unspezifische Reaktion infolge der Injektionen ist, wurde der folgende Kontrollversuch durchgeführt:

3c) Das Verhalten der SLDH bei Normaltieren bei Injektion von proteolytischen Fermenten bzw. phys. NaCl-Lösung

Versuchsanordnung:

Verwendung von 14 Tieren, die in 2 Gruppen zu je 7 Tieren geteilt wurden. Gruppe a wurde täglich mit 0,2 ml (= 10 mg) des Fermentpräparates i.p. gespritzt und Gruppe b jeweils mit 0,2 ml phys. NaCl, insgesamt 10 Injektionen. Zur Bestimmung der SLDH wurde jeden 2. Tag allen Mäusen Blut abgenommen und von jeder Gruppe ein Mischserum verwendet. Der Anfangswert wurde vor der 1. Injektion bestimmt.

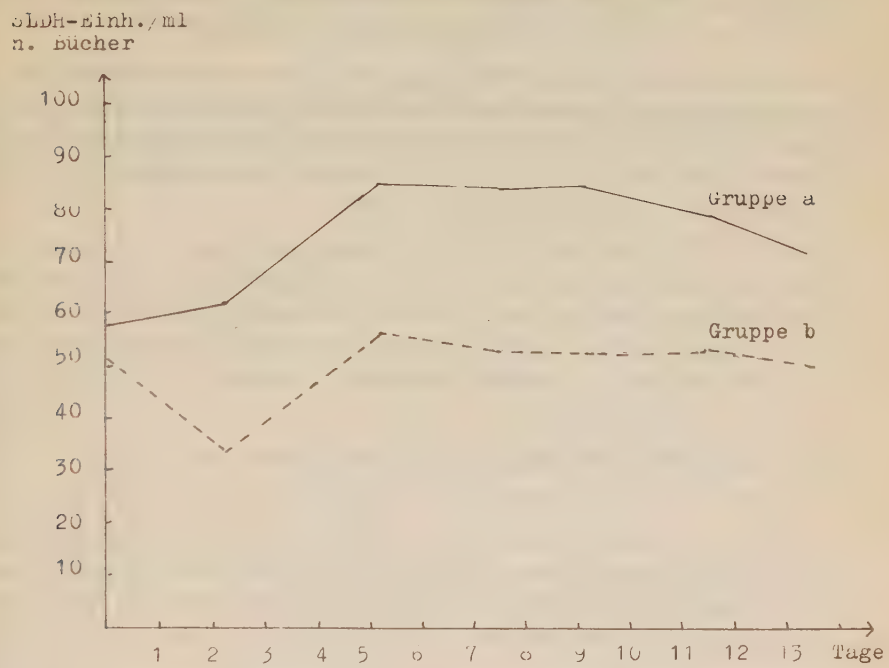
TABELLE X

SLDH-Werte bei gesunden Mäusen nach Injektion von proteolytischen Fermenten bzw. phys. NaCl-Lösung

Tiergruppe	Anfangswert	2. Tag	5. Tag	7. Tag	9. Tag	12. Tag	14. Tag
a	58	62	84	83	83	79	71
b	51	34	55	53	52	53	50

Die Zahlen bedeuten SLDH-Einheiten nach Bücher.

SLDH-Mittelwerte im Laufe des Versuches:



Von den Tieren starb keines im Laufe des Versuches. Äusserlich konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

Ergebnis:

Die Behandlung von Normaltieren mit proteolytischen Fermenten gab eine deutliche Erhöhung der SLDH-Aktivität. Dies kann nicht als unspezifische Reaktion auf die Injektionen und Blutentnahmen erklärt werden, da die SLDH bei den mit phys. NaCl behandelten Tieren annähernd konstant blieb.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde zu den bekannten analytischen Methoden der Bestimmung fibrinolytischer und thrombolytischer Vorgänge Stellung genommen.

2. Eine erstmals von A. GASCHLER angegebene, später von anderen Autoren verwendete und modifizierte Methode der Erfassung proteolytischer Vorgänge im Blut, die auf der Bestimmung von freigelegten Erythrocyten aus Blutkoagula beruht, wird experimentell an Blut von gesunden und malignom-erkrankten Menschen auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft.

3. In 17 von 18 untersuchten Fällen von Normalpersonen und in 50 von 51 Fällen von gynäkologischen Carcinomen wurden gegenüber der Norm stark erniedrigte Werte gefunden, so dass bei den Carcinompatienten die Angaben der Literatur bestätigt wurden (verminderte Freilegung von Hämoglobin aus den Fibrinkoagula, als Ausdruck verminderter proteolytischer Aktivität = Hinweis auf malignen Tumor).

4. Die zweckhafte Verwendbarkeit der Methode wurde aber in Hinsicht auf ebenfalls niedrige Werte bei gesunden Versuchspersonen angezweifelt.

5. Gleichzeitig vergleichend durchgeführte Plasminogen/Plasminbestimmung mit einer grundsätzlich anderen Methode der Caseinspaltung zeigen keine Korrelation beider Methoden in dem Sinn, dass hohe Werte der Erythrocytenfreilegung einer hohen fibrinolytischen Aktivität entsprechen.

6. Es wird ein kurzer Überblick über die therapeutische Anwendung von proteolytischen Enzymen gegeben und die Möglichkeit ihrer Beeinflussung von Malignomen diskutiert.

7. Die von DOWNIE und CLIFFTON angegebene Methode der Plasminogen/Plasminbestimmung wurde zur Untersuchung von Mäusesera in eine Mikromethode abgewandelt.

8. Es wird die Beeinflussbarkeit von Ascitestumoren und soliden Tumoren bei Mäusen durch subcutane, intraperitoneale und intratumorale Injektion von proteolytischen Fermenten geprüft.

9. Durch die Behandlung wurde keine Änderung der Caseinspaltung durch das Serum gefunden, keine Verkleinerung oder ein Verschwinden von Tumoren erreicht und die Überlebenszeit gegenüber Kontrolltieren durchschnittlich gering verkürzt. Die möglichen Ursachen dieses Effektes wurden diskutiert.

10. Es wird bei SA-I-infizierten Mäusen das Verhalten der SLDH-Aktivität, deren charakteristischer Anstieg auf dem Wachstum des Tumors und der Vermehrung des damit gleichzeitig auftretenden Virus (Ryley-Virus) beruht, nach Behandlung mit proteolytischen Fermenten geprüft.

11. Es wurde eine starke Erhöhung der SLDH-Aktivität gefunden und die Möglichkeiten einer Erklärung dieser Aktivitätssteigerung diskutiert. Durch Kontrollversuche an Normaltieren konnte eine unspezifische Reaktion als Ursache ausgeschlossen werden.

LITERATUR

(1) Gaschler, A. Die parenterale Fermenttherapie maligner Tumoren und chron. Entzündungszustände.
Haug Verlag 1954

(2) Schmähl, D., Nasemann, Th.
Vortrag Nr. 12 und Diskussionsbeitrag, Krebskongress München Feb. 1966

(3) Halse, Th. Die Fibrinolyse,
Ed. Cantor, Freiburg 1948

(4) Deutsch, E. Vortrag 1962 Wiesbaden, Kongress d. Deutsch. Gesellsch. f. Hämatologie.

(5) Astrup, T. Mediz. Grundlagenforschung.
Thieme Verlag Stuttgart 1959

(6) Bayerle, H., Marx, R., Heyn, H.
Ärztl. Forschg. 3, 279 (1947)

(7) Marx, R. Blut 1, 275 (1955)

(8) McFarlane, R.G., Biggs, R.
Blood 3, 1167 (1948)

(9) Bayerle, H., Kirstein, G.
Klin. Wo. 30. Jhg., Heft 15/16 (1952)

(10) Bayerle, H., Kammhuber, K.
Blut IV, 2, 78 (1958)

(11) Astrup, T. Biochem. J. 50, 5 (1951)

(12) Clement, W.E., McNicol, G.P.
J. Clin. Path. 12, 544 (1959)

(13) Sawyer, W.D., Fletcher, A.P., Alkjaersig, N., Sherry, S.
Thromb. Diath. Haemorrh. 5, 149 (1961)

(14) Marx, R., Bayerle, H.
Hoppe-Seyler's Z. phys. Che. 283, 215 (1948)

(15) Downie, G., Cliffton, E.E.
Proc. Soc. Exp. Med. 71, 138 (1949)

(16) Milstone, H.I.
Immunol.42, 109 (1941)

(17) Dillard, G., Chanutin, A.
Cancer Research 9, 665 (1949)

(18) Rocha e Silva, M., Rimington, C.
The Bioch.J.43, 163 (1948)

(19) Lewig, J., Ferguson, I., Jackson, B.
Proc.Soc.Biol.Med.72, 703 (1949)

(20) Troll, W., Sherry, S.
J.of Biol.Chem.208, 85 (1954)
213, 881 (1955)

(21) Gaschler, A. Hippokrates 21, 670 (1957)

(22) Dyballa, R. Deutsch.Med.J.9, 298 (1960)

(23) Dorrer, R. Erfahrungsheilk.14, 373 (1965)

(24) Wolf, M. Vortrag Sept.1963 München

(25) Clark, D., Cliffton, E., Newton, B.
Proc.Soc.Exp.Med.69, 276 (1948)

(26) Greuer, W. Die proteolyt. Enzyme im Krankheitsgeschehen.
Ed.Cantor (1962)

(27) Monninger, R. E.E.N.T.Digest Nov.1961

(28) Bogner, R., Clifford, C.
J.of the Intern.Coll.of Surgeons 37, 289 (1962)

(29) Coleman, I. u. Mitarb.
Scientif.Session of the Chicago Medic.Society Feb.1962

(30) Kabakoff, B., Wohlman, A., Umhey, M., Avakan, S.
Nature Aug.1963

(31) Pollack, P. Current Therap.Research 4, 229 (1962)

(32) Innerfield, I., Wernik, Th.
Proc.Soc.Exp.Med.107, 506 (1961)

(33) Shaw, Mackenzie
Brit.Med.J.240 (1906)

(34) Beard, J. Brit.Med.J.140 (1906)

(35) Beard, J. The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis. Chatto a. Windus London 1911

(36) Rosanova, A. Ärztl.Praxis Jhg.16, N.36 (1964)

(37) Broschüren derFirma Mugos-Emulsionsgesellschaft.

LEBENSLAUF

Am 11.1.1940 wurde ich, Eva Maria Anzer, als Tochter des Schreinermeisters Theodor Anzer und seiner Frau Eugenie, geb. Benka, in München geboren. Nach Besuch der Volksschule und der Oberrealschule am St. Anna Platz in München legte ich dort 1959 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1959/60 begann ich das Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität München. Nach dem Physikum studierte ich ein Semester an der Universität Innsbruck, die weiteren klinischen Semester wieder an der Universität München und legte hier im August 1965 das medizinische Staatsexamen ab.

Danach war ich 6 1/2 Monate am Pathologischen Institut der Universität München und 5 Monate an der Chirurgischen Privatklinik Dr. Riefler in München als Medizinalassistent tätig. Seit Oktober 1966 arbeite ich auf der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Berchtesgaden.